

RECORD COPY

**INTERNATIONAL APPLICATION
UNDER THE
PATENT COOPERATION TREATY**

REQUEST

**THE UNDERSIGNED REQUESTS THAT THE PRESENT
INTERNATIONAL APPLICATION BE PROCESSED
ACCORDING TO THE PATENT COOPERATION TREATY**

22 Rec'd PCT/PTO 2 n JUL 1992

(The following is to be filled in by the receiving Office)

**INTERNATIONAL
APPLICATION No.:**

PCT/SE 91/00892

**INTERNATIONAL
FILING DATE:**

1991 -12- 20

The Swedish Patent Office
PCT International Application

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(indicated by applicant if desired)

2912327

Box No. I TITLE OF INVENTION

**GENETICALLY ENGINEERED MODIFICATION OF POTATO TO FORM
AMYLOPECTIN-TYPE STARCH**

Box No. II APPLICANT (WHETHER OR NOT ALSO INVENTOR); DESIGNATED STATES FOR WHICH HE/SHE/IT IS APPLICANT. Use this box for indicating the applicant or, if there are several applicants, one of them. If more than one person (includes, where applicable, a legal entity) is involved, continue in Box No. III.

The person identified in this box is (mark one check-box only): applicant and inventor* applicant only

Name and address: **

AMYLOGENE HB
c/o SVALÖF AB
S-268 81 SVALÖV
Sweden

Telephone number (including area code): Telegraphic address: Teleprinter address:

State of nationality: **Sweden**

State of residence: * **Sweden**

The person identified in this box is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the "Supplemental Box"

Box No. III FURTHER APPLICANTS, IF ANY; (FURTHER) INVENTORS, IF ANY; DESIGNATED STATES FOR WHICH THEY ARE APPLICANTS (IF APPLICABLE). A separate sub-box has to be filled in in respect of each person (includes, where applicable, a legal entity). If the following two sub-boxes are insufficient, continue in the "Supplemental Box," (giving there for each additional person the same indications as those requested in the following two sub-boxes) or by using a "continuation sheet."

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only): applicant and inventor* applicant only inventor only*

Name and address: **

HOFVANDER, Per
Doppinggränd 8
S-230 11 FALSTERBO
Sweden

If the person identified in this sub-box is *applicant* or *applicant and inventor*, indicate also:

State of nationality: **Sweden**

State of residence: * **Sweden**

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the "Supplemental Box"

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only): applicant and inventor* applicant only inventor only*

Name and address: **

PERSSON, Per T.
Travgatan 9
S-291 65 KRISTIANSTAD
Sweden

If the person identified in this sub-box is *applicant* or *applicant and inventor*, indicate also:

State of nationality: **Sweden**

State of residence: * **Sweden**

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the "Supplemental Box"

* If the person indicated as "applicant and inventor" or as "inventor only" is not an *inventor* for the purposes of all the designated States, give the necessary indications in the "Supplemental Box."

** Indicate the name of a natural person by giving his/her family name first followed by the given names(s). Indicate the name of a legal entity by its full official designation. In the address, include both the postal code (if any) and the State (name).

*** If residence is not indicated, it will be assumed that the State of residence is the same as the State indicated in the address.

R180

Box No. III CONTINUATION (If REQUIRED) FURTHER APPLICANTS, IF ANY; FURTHER INVENTORS, IF ANY; DESIGNATED STATES FOR WHICH THEY ARE APPLICANTS (IF APPLICABLE). A separate sub-box has to be filled in in respect of each person (includes, where applicable, a legal entity).

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only): applicant and inventor* applicant only inventor only*

Name and address:**

TALLBERG, Anneli
Drapavägen 69
S-223 74 LUND
Sweden

If the person identified in this sub-box is *applicant (or applicant and inventor)*, indicate also:

State of nationality: State of residence:***

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the "Supplemental Box"

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only): applicant and inventor* applicant only inventor only*

Name and address:**

WIKSTRÖM, Olle
Wasagatan 1
S-291 53 KRISTIANSTAD
Sweden

If the person identified in this sub-box is *applicant (or applicant and inventor)*, indicate also:

State of nationality: Sweden

State of residence:*** Sweden

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the "Supplemental Box"

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only): applicant and inventor* applicant only inventor only*

Name and address:**

If the person identified in this sub-box is *applicant (or applicant and inventor)*, indicate also:

State of nationality:

State of residence:***

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the "Supplemental Box"

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only): applicant and inventor* applicant only inventor only*

Name and address:**

If the person identified in this sub-box is *applicant (or applicant and inventor)*, indicate also:

State of nationality:

State of residence:***

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the "Supplemental Box"

- * If the person indicated as "applicant and inventor" or as "inventor only" is not an *inventor* for the purposes of all the designated States, give the necessary indications in the "Supplemental box."
- ** Indicate the name of a natural person by giving his/her family name first followed by the given name(s). Indicate the name of a legal entity by its full official designation. In the address, include both the postal code (if any) and the State (name).
- *** If residence is not indicated, it will be assumed that the State of residence is the same as the State indicated in the address.

If this continuation sheet is not used, it need not be included in the Request.

P181

Box No. IV AGENT (IF ANY) OR COMMON REPRESENTATIVE (IF ANY); ADDRESS FOR NOTIFICATIONS (IN CERTAIN CASES). A common representative may be appointed only if there are several applicants and if no agent is or has been appointed; the common representative must be one of the applicants.
The following person (includes, where applicable, a legal entity) is hereby has been appointed as agent or common representative to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities:

Name and address, including postal code and country:

If the space below is used instead for an address for notifications, mark here:

AWAPATENT AB
Box 5117
S-200 71 Malmö
Sweden

Telephone number (including area code): +46 40 71620 Telegraphic address: awapatent malmoe Teleprinter address: 32407 awapat S

Box No. V DESIGNATION OF GROUPS OF STATES OR STATES⁽¹⁾; CHOICE OF CERTAIN KINDS OF PROTECTION OR TREATMENT. The following designations are hereby made (please mark the applicable check-boxes):

Regional Patent

- EP European Patent⁽²⁾: AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IT Italy, LU Luxembourg, NL Netherlands, SE Sweden, MC Monaco and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- OA OAPI Patent: Benin, Burkina Faso, Cameroon, Central African Republic, Chad, Congo, Gabon, Mali, Mauritania, Senegal, Togo, and any other State which is a Contracting State of OAPI and of the PCT: if other OAPI title desired, specify on dotted line⁽³⁾:

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line⁽³⁾)

- | | |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Austria ⁽³⁾ | <input type="checkbox"/> KR Republic of Korea ⁽³⁾ |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia ⁽³⁾ | <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg ⁽³⁾ |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria ⁽³⁾ | <input checked="" type="checkbox"/> MC Monaco ⁽³⁾ |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil ⁽³⁾ | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi ⁽³⁾ |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NL Netherlands |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Germany ⁽³⁾ | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland ⁽³⁾ |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spain ⁽³⁾ | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finland | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> SU Soviet Union ⁽³⁾ |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan ⁽³⁾ | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America ⁽³⁾ |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea ⁽³⁾ | |
| | |

Space reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after the issuance of this sheet:

- (1) The applicant's choice of the order of designations may be indicated by marking the check-boxes with sequential arabic numerals (see also the "Notes to Box No. V").
- (2) The selection of particular States for a European patent can be made upon entering the national (regional) phase before the European Patent Office (see also the "Notes to Box No. V").
- (3) If another kind of protection or a title of addition or, in the United States of America, treatment as a continuation or a continuation-in-part is desired, specify according to the instructions given in the "Notes to Box No. V."

R182

Box No. VI PRIORITY CLAIM (IF ANY). The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Country (country in which it was filed if national application; one of the countries for which it was filed if regional or international application)	Filing Date (day, month, year)	Application No.	Office of filing (fill in only if the earlier application is an international application or a regional application)
(1) Sweden	21 December 1990 21.12.1990	9004096-5	
(2)			
(3)			

(Letter codes may be used to indicate country and/or Office of filing)

When the earlier application was filed with the Office which, for the purposes of the present international application, is the receiving Office, the applicant may, *against payment of the required fee*, ask the following:

the receiving Office is hereby requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the above-mentioned earlier application/of the earlier applications identified above by the numbers (insert the applicable numbers)
9004096-5

Box No. VII EARLIER SEARCH (IF ANY). Fill in where a search (international, international-type or other) by the International Searching Authority has already been requested (or completed) and the said Authority is now requested to base the international search, to the extent possible, on the results of the said earlier search. Identify such search or request either by reference to the relevant application (or the translation thereof) or by reference to the search request.

International application number or number and country (or regional Office) of other application:	9004096-5	International/regional/national filing date:	21.12.1990
Date of request for search:	21.12.1990	Number (if available) given to search request:	SE90/00595

Box No. VIII SIGNATURE OF APPLICANT(S) OR AGENT

Ingrid Wiklund

If the present Request form is signed on behalf of any applicant by an agent, a separate power of attorney appointing the agent and signed by the applicant is required. If in such case it is desired to make use of a general power of attorney (deposited with the receiving Office), a copy thereof must be attached to this form.

Box No. IX CHECK LIST (To be filled in by the Applicant)

This international application contains the following number of sheets:	
1. request	4 sheets
2. description	✓ 31 sheets
3. claims	→ 2 sheets
4. abstract	✓ 1 sheets
5. drawings	✓ 6 sheets
Total	✓ 44 sheets

Figure number 2 of the drawings (if any) is suggested to accompany the abstract for publication.

This international application as filed is accompanied by the items marked below:

1. separate signed power of attorney 3 st
2. copy of general power of attorney
3. priority document(s) (see Box No. VI)
4. receipt of the fees paid or revenue stamps
5. cheque for the payment of fees
6. request to charge deposit account
7. other document (specify) fee calculation sheet
8. copy of official letter

(The following is to be filled in by the receiving Office) 9. ITS-Search Report

1. Date of actual receipt of the purported international application:

1991 -12- 20

2. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:

3. Date of timely receipt of the required corrections under Article 11 of the PCT:

4. Drawings Received No Drawings

(The following is to be filled in by the International Bureau)

Date of receipt of the record copy:

20 JANUARY 1992

20.01.92

P/153

**INTERNATIONAL APPLICATION
UNDER THE
PATENT COOPERATION TREATY
REQUEST**

**THE UNDERSIGNED REQUESTS THAT THE PRESENT
INTERNATIONAL APPLICATION BE PROCESSED
ACCORDING TO THE PATENT COOPERATION TREATY**

(The following is to be filled in by the receiving Office)

**INTERNATIONAL
APPLICATION No.:**

**INTERNATIONAL
FILING DATE:**

(Stamp)

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(indicated by applicant if desired)

2912327

Box No. I TITLE OF INVENTION

**GENETICALLY ENGINEERED MODIFICATION OF POTATO TO FORM
AMYLOPECTIN-TYPE STARCH**

Box No. II APPLICANT (WHETHER OR NOT ALSO INVENTOR); DESIGNATED STATES FOR WHICH HE-SHE/IT IS APPLICANT. Use this box for indicating the applicant or, if there are several applicants, one of them. If more than one person (includes, where applicable, a legal entity) is involved, continue in Box No. III.

The person identified in this box is (mark one check-box only):

applicant and
inventor*

applicant
only

Name and address: **

AMYLOGENE HB
c/o SVALÖF AB
S-268 81 SVALÖV
Sweden

Telephone number (including area code): Telegraphic address: Teleprinter address:

State of nationality: **Sweden**

State of residence:* **Sweden**

The person identified in this box is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the "Supplemental Box"

Box No. III FURTHER APPLICANTS, IF ANY; (FURTHER) INVENTORS, IF ANY; DESIGNATED STATES FOR WHICH THEY ARE APPLICANTS (IF APPLICABLE). A separate sub-box has to be filled in in respect of each person (includes, where applicable, a legal entity). If the following two sub-boxes are insufficient, continue in the "Supplemental Box," (giving there for each additional person the same indications as those requested in the following two sub-boxes) or by using a "continuation sheet."

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only): applicant and
inventor* applicant only inventor only*

Name and address: **

HOFVANDER, Per
Doppinggränd 8
S-230 11 FALSTERBO
Sweden

If the person identified in this sub-box is *applicant* or *applicant and inventor*, indicate also:

State of nationality: **Sweden**

State of residence:* **Sweden**

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the "Supplemental Box"

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only): applicant and
inventor* applicant only inventor only*

Name and address: **

PERSSON, Per T.
Travgatan 9
S-291 65 KRISTIANSTAD
Sweden

If the person identified in this sub-box is *applicant* or *applicant and inventor*, indicate also:

State of nationality: **Sweden**

State of residence:* **Sweden**

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the "Supplemental Box"

* If the person indicated as "applicant and inventor" or as "inventor only" is not an *inventor* for the purposes of all the designated States, give the necessary indication in the "Supplemental Box."

** Indicate the name of a natural person by giving his/her family name first followed by the given name(s). Indicate the name of a legal entity by its full official designation. In the address, include both the postal code (if any) and the State (name).

*** If residence is not indicated, it will be assumed that the State of residence is the same as the State indicated in the address.

'Box No. III CONTINUATION (IF REQUIRED) FURTHER APPLICANTS, IF ANY, (FURTHER) INVENTORS, IF ANY; DESIGNATED STATES FOR WHICH THEY ARE APPLICANTS (IF APPLICABLE). A separate sub-box has to be filled in in respect of each person (includes, where applicable, a legal entity).

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only): applicant and inventor* applicant only inventor only*

Name and address:**

TALLBERG, Anneli
Drapavägen 69
S-223 74 LUND
Sweden

If the person identified in this sub-box is *applicant (or applicant and inventor)*, indicate also:

State of nationality: State of residence:***

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the "Supplemental Box"

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only): applicant and inventor* applicant only inventor only*

Name and address:**

VIKSTRÖM, Olle
Wasagatan 1
S-291 53 KRISTIANSTAD
Sweden

If the person identified in this sub-box is *applicant (or applicant and inventor)*, indicate also:

State of nationality: Sweden

State of residence:*** Sweden

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the "Supplemental Box"

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only): applicant and inventor* applicant only inventor only*

Name and address:**

If the person identified in this sub-box is *applicant (or applicant and inventor)*, indicate also:

State of nationality:

State of residence:***

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the "Supplemental Box"

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only): applicant and inventor* applicant only inventor only*

Name and address:**

If the person identified in this sub-box is *applicant (or applicant and inventor)*, indicate also:

State of nationality:

State of residence:***

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the "Supplemental Box"

* If the person indicated as "applicant and inventor" or as "inventor only" is not an *inventor* for the purposes of all the designated States, give the necessary indications in the "Supplemental box."

** Indicate the name of a natural person by giving his/her family name first followed by the given name(s). Indicate the name of a legal entity by its full official designation. In the address, include both the postal code (if any) and the State (name).

*** If residence is not indicated, it will be assumed that the State of residence is the same as the State indicated in the address.

If this continuation sheet is not used, it need not be included in the Request.

Box No. IV AGENT (IF ANY) OR COMMON REPRESENTATIVE (IF ANY); ADDRESS FOR NOTIFICATIONS (IN CERTAIN CASES). A common representative may be appointed only if there are several applicants and if no agent is or has been appointed; the common representative must be one of the applicants.
The following person (includes, where applicable, a legal entity) is hereby appointed as agent or common representative to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities:

Name and address, including postal code and country:

If the space below is used instead for
an address for notifications, mark here:

AWAPATENT AB
Box 5117
S-200 71 MALMÖ
Sweden

Telephone number (including area code):
+46 40 71620

Telegraphic address:

awapatent malmoe

Teleprinter address:

32407 awapat S

Box No. V DESIGNATION OF GROUPS OF STATES OR STATES⁽¹⁾; CHOICE OF CERTAIN KINDS OF PROTECTION OR TREATMENT. The following designations are hereby made (please mark the applicable check-boxes):

Regional Patent

- EP European Patent⁽²⁾: AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IT Italy, LU Luxembourg, NL Netherlands, SE Sweden, MC Monaco and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- OA OAPI Patent: Benin, Burkina Faso, Cameroon, Central African Republic, Chad, Congo, Gabon, Mali, Mauritania, Senegal, Togo, and any other State which is a Contracting State of OAPI and of the PCT; if other OAPI title desired, specify on dotted line⁽³⁾:
-

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line⁽³⁾)

- | | |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Austria ⁽³⁾ | <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea ⁽³⁾ |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia ⁽³⁾ | <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg ⁽³⁾ |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria ⁽³⁾ | <input checked="" type="checkbox"/> MC Monaco ⁽³⁾ |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil ⁽³⁾ | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi ⁽³⁾ |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NL Netherlands |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Germany ⁽³⁾ | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland ⁽³⁾ |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spain ⁽³⁾ | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finland | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> SU Soviet Union ⁽³⁾ |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan ⁽³⁾ | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea ⁽³⁾ | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America ⁽³⁾ |
| | |

Space reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after the issuance of this sheet:

.....

(1) The applicant's choice of the order of designations may be indicated by marking the check-boxes with sequential arabic numerals (see also the "Notes to Box No. V").

(2) The selection of particular States for a European patent can be made upon entering the national (regional) phase before the European Patent Office (see also the "Notes to Box No. V").

(3) If another kind of protection or a title of addition or, in the United States of America, treatment as a continuation or a continuation-in-part is desired, specify according to the instructions given in the "Notes to Box No. V".

Box No. VI PRIORITY CLAIM (IF ANY). The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Country (country in which it was filed if national application; one of the countries for which it was filed if regional or international application)	Filing Date (day, month, year)	Application No.	Office of filing (fill in only if the earlier application is an international application or a regional application)
(1) Sweden	21 December 1990 21.12.1990	9004096-5	
(2)			
(3)			

(Letter codes may be used to indicate country and/or Office of filing)

When the earlier application was filed with the Office which, for the purposes of the present international application, is the receiving Office, the applicant may, *against payment of the required fee*, ask the following:

the receiving Office is hereby requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the above-mentioned earlier application of the earlier applications identified above by the numbers (insert the applicable numbers)
9004096-5.....

Box No. VII EARLIER SEARCH (IF ANY). Fill in where a search (international, international-type or other) by the International Searching Authority has already been requested (or completed) and the said Authority is now requested to base the international search, to the extent possible, on the results of the said earlier search. Identify such search or request either by reference to the relevant application (or the translation thereof) or by reference to the search request.

International application number or number and country (or regional Office) of other application:

9004096-5

International/regional/national filing date:

21.12.1990

Date of request for search:

21.12.1990

Number (if available) given to search request:

SE90/00595

Box No. VIII SIGNATURE OF APPLICANT(S) OR AGENT

Ingrid Wiklund

If the present Request form is signed on behalf of any applicant by an agent, a separate power of attorney appointing the agent and signed by the applicant is required. If in such case it is desired to make use of a general power of attorney (deposited with the receiving Office), a copy thereof must be attached to this form.

Box No. IX CHECK LIST (To be filled in by the Applicant)

This international application contains the following number of sheets:

- | | |
|----------------|-----------------|
| 1. request | 4 sheets |
| 2. description | 31 sheets |
| 3. claims | 2 sheets |
| 4. abstract | 1 sheets |
| 5. drawings | 6 sheets |
| | Total 44 sheets |

Figure number 2 of the drawings (if any) is suggested to accompany the abstract for publication.

This international application as filed is accompanied by the items marked below:

1. separate signed power of attorney 3 st
2. copy of general power of attorney
3. priority document(s) (see Box No. VI)
4. receipt of the fees paid or revenue stamps
5. cheque for the payment of fees
6. request to charge deposit account
7. other document (specify) fee calculation sheet
8. copy of official letter

(The following is to be filled in by the receiving Office) 9. ITS-Search Report

1. Date of actual receipt of the purported international application:

2. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:

3. Date of timely receipt of the required corrections under Article 11 of the PCT:

4. Drawings Received No Drawings

(The following is to be filled in by the International Bureau)

Date of receipt of the record copy:

GENTEKNISK FÖRÄNDRING AV POTATIS FÖR BILDNING AV STÄRKELSE
AV AMYLOPEKTINTYP

Föreliggande uppföring avser genteknisk förändring
 5 av potatis, vilken resulterar i bildning av praktiskt ta-
 get enbart stärkelse av amylopektintyp i potatisen. Den
 gentekniska förändringen innebär införande av genfragment
 i potatis, vilka genfragment omfattar delar av ledarsek-
 vens, translationsstart, translationsslut och trailer-sek-
 10 vens samt kodande och icke-kodande (dvs exoner och intro-
 ner) delar av genen för stärkelsekornbundet stärkelsesyn-
 tas, insatta i antisens-riktnings.

Uppfinningens bakgrund

Stärkelse i olika former har stor betydelse inom
 15 livsmedels- och pappersindustrin. I framtiden kommer stär-
 kelse också att utgöra en stor potential för tillverkning
 av i naturen nedbrytbara polymerer, t ex för användning
 som förpackningsmaterial. Många olika stärkelseprodukter
 är kända, vilka framställts genom derivatisering av nativ
 20 stärkelse med ursprung i bl a majs och potatis. Stärkelse
 från potatis respektive från majs konkurrerar inom de
 flesta marknadsmråden.

I potatisknölen utgör stärkelse den största andelen
 av torrsubstansen. Ca 1/4 till 1/5 av stärkelsen i potatis
 25 utgöres av amylos, medan resten av stärkelsen är amylopek-
 tin. Dessa båda komponenter av stärkelsen har olika an-
 vändningsmråden och det är därför av stort intresse att
 kunna framställa antingen rent amylos eller rent amylopek-
 tin. De båda stärkelsekomponenterna kan framställas ur
 30 vanlig stärkelse, vilket kräver många processteg och därigenom blir dyrbart och omständligt.

Det har nu visat sig att det med genteknologi är möj-
 ligt att förändra potatis så att knölarne endast produc-
 rar huvudsakligen stärkelse av den ena eller andra typen.
 35 Härigenom skapas en stärkelsekvalitet som kan konkurrera
 på de områden där potatisstärkelse idag normalt ej an-
 vänds. Stärkelse från sådan gentekniskt förändrad potatis

har stor potential som livsmedelstillsats, eftersom den inte genomgått någon kemisk modifieringsprocess.

Stärkelseesyntes

Syntesen av stärkelse och regleringen därav studeras för närvarande med stort intresse, både på grundforskningsnivå och med tanke på industriell tillämpning. Fastän man känner till mycket om vissa enzymers medverkan i omvandlingen av sackaros till stärkelse, är stärkelsens biosyntes ännu inte klarlagd. Genom undersökning av framför allt majs har man dock kunnat klärlägga en del av syntesvägarna och de enzymer som deltar i dessa reaktioner. De viktigaste stärkelseyttertiserande enzymerna för uppbyggnad av stärkelsekornen är stärkelseesyntas och "branching enzyme". I majs har man hittills påvisat och studerat tre former av stärkelseesyntas, varav två är lösliga och en är olösligt associerad till stärkelsekornen. Även "branching enzyme" består av tre former, vilka troligen kodas av tre olika gener (Mac Donald & Preiss, 1985; Preiss, 1988).

waxy-genen i majs

Syntesen av stärkelsekomponenten amylos sker huvudsakligen genom inverkan av stärkelseyttertisetet alfa-1,4-D-glukan-4-alfa-glukosyltransferas (EC 2.4.1.21), som är associerat med stärkelsekornen i växtcellen. Genen som kodar för detta stärkelsekornbundna enzym kallas "waxy" (= wx⁺), medan enzymet benämns "GBSS" (granule bound starch synthase).

waxy-locus i majs har grundligt karaktäriserats, såväl genetiskt som biokemiskt. waxy-genen, belägen på kromosom 9, kontrollerar produktionen av amylos i endosperm, pollen och embryosäck. Stärkelsen som bildas i endosperm hos normal majs med wx⁺-allelen består till 25% av amylos och till 75% av amylopektin. En mutant form av majs har påträffats, i vilken endospermet innehåller en mutation lokaliseras till wx⁺-genen, varför inget funktionsdugligt GBSS syntetiseras. Endosperm från denna mutantmajs innehåller därför enbart amylopektin som stärkelsekomponent. Denna s k waxy-mutant innehåller således varken GBSS eller amylos (Echt & Schwartz, 1981).

- GBSS-proteinet kodas av wx^+ -genen i cellkärnan men transportereras till och är verksamt i amyloplasten. Preproteinet består därför av två komponenter, nämligen en 7 kD transitpeptid för transport av proteinet över amyloplast-
 5 membranet samt det egentliga proteinet, som är 58 kD. Den kodande regionen av wx^+ -genen i majs är 3,7 kb lång och består av 14 exoner och 13 introner. Flera av regulations-
 10 signalerna i promotorregionen är kända och två olika polyadenyleringssekvenser har beskrivits (Klösgen et al, 1986; Schwartz-Sommer et al, 1984; Shure et al, 1983).

Amylosenzym i potatis

- I potatis har man identifierat ett 60 kD protein, som utgör det huvudsakliga stärkelsekornbundna proteinet. Eftersom antikroppar mot detta potatisenzym korsreagerar med
 15 GBSS från majs antar man att det är det stärkelsekornbundna syntaset (Vos-Schepelerkeuter et al, 1986). Genen för potatis-GBSS har dock hittills inte karakteriseras i samma utsträckning som waxy-genen i majs, varken vad gäller lokalisering eller uppbyggnad.

- 20 Naturligt förekommande waxy-mutanter har beskrivits för korn, ris och sorghum förutom för majs. I potatis har man inte funnit någon naturlig mutant, men ändå har man framställt en mutant genom röntgenbestrålning av blad från en monohaploid ($n=12$) planta (Visser et al, 1987). Stär-
 25 kelse isolerad från knölar av denna mutant innehåller varken GBSS-proteinet eller amylos. Mutanten betingas av en enkel recessiv gen och benämns amf. Den kan liknas vid waxy-mutanter av andra växtslag eftersom såväl GBSS-proteinet som amylos saknas. Stabiliteten av kromosomtalet
 30 försvagas dock då detta fyrdubblas till det naturliga talet ($n=48$), vilket kan förorsaka negativa effekter på potatisplantorna (Jacobsen et al, 1990).

Inhibering av amylosproduktion

- Syntesen av amylos kan drastiskt reduceras genom in-
 35 hibering av det stärkelsekornbundna stärkelsesyntaset, GBSS, vilket katalyserar bildningen av amylos. Denna inhibering resulterar i att stärkelsen huvudsakligen kommer att bestå av amylopektin.

Inhibering av bildningen av enzym kan åstadkommas på flera sätt, t ex genom:

- mutagenbehandling, vilket medför en förändring av gensekvensen som kodar för bildningen av enzymet
- 5 - införlivande av en transposon i gensekvensen som kodar för enzymet
- genteknisk modifiering så att genen som kodar för enzymet inte uttrycks, t ex antisens-geninhibering.

I fig 1 visas ett specifikt undertryckande av normal genexpression genom att en komplementär antisens-nukleotid 10 får hybridisera med mRNA för en målgen. Antisens-nukleotiden är således antisens-RNA, som transkriberas in vivo från en "omvänt" gensekvens (Izant, 1989).

Genom användning av antisens-teknik har olika genfunktioner i växter inhiberats. Antisens-konstruktionen för chalkonsyntas, polygalakturonas och fosfinotricin-acetyltransferas har använts för att inhibera motsvarande enzym i växtslagen petunia, tomat respektive tobak.

Inhibering av amylos i potatis

I potatis har man tidigare försökt inhibera syntesen av det stärkelsekornbundna stärkelsesyntasetet (GBSS-proteinet) med en antisens-konstruktion motsvarande genen som kodar för GBSS (i fortsättningen benämns denna gen "GBSS-genen"). Hergersberger (1988) beskriver en metod, genom vilken en cDNA-klon för GBSS-genen i potatis har isolerats med hjälp av en cDNA-klon för wx^+ -genen i majs. En antisens-konstruktion baserad på hela cDNA-klonen överfördes till bladdiskar av potatis med hjälp av Agrobacterium tumefaciens. I mikroknölar inducerade in vitro från regenererade potatisskott observerades en varierande och mycket svag reduktion av amyloshalten, visad i diagram. Någon fullständig karaktärisering av GBSS-genen ges inte. Genen för GBSS-proteinet i potatis har ytterligare karaktäriserats genom att en genomisk wx^+ -klon undersöks med restriktionsanalys. Dock har klonens DNA-sekvens inte bestämts (Visser et al, 1989).

Ytterligare försök med en antisens-konstruktion motsvarande GBSS-genen i potatis har rapporterats. Antisens-konstruktionen, som bygger på en cDNA-klon tillsammans med CaMV 35S-promotorn, har transformerats med hjälp av

- 5 *Agrobacterium rhizogenes*. Transformationen resulterade enligt uppgift i lägre amylosinnehåll i potatisen, men inga värden redovisas (Flavell, 1990).

Ingen av de hittills använda metoderna för genteknisk förändring av potatis har resulterat i potatis med praktiskt taget ingen stärkelse av amylostyp.

Ändamålet med uppfinningen är därför att åstadkomma ett så gott som fullständigt undertryckande av bildningen av amylos i potatisknölar.

Sammanfattning av uppfinningen

- 15 Enligt uppfinningen inhiberas funktionen av GBSS-genen och därmed amylosproduktionen i potatis genom användning av helt nya antisens-konstruktioner. För bildning av antisens-fragmenten enligt uppfinningen utgår man från den genomiska GBSS-genen för att uppnå en så effektiv inhibition av GBSS och därigenom av amylosproduktionen som möjligt. Antisens-konstruktionerna enligt uppfinningen omfattar såväl kodande som icke-kodande delar av GBSS-genen som motsvarar sekvenser i regionen omfattande promotor samt ledarsekvens, translationsstart, translationsslut samt 20 trailer-sekvens i antisens-riktnings. För att få ett vävnadsspecifikt uttryck, dvs amylosproduktionen skall inhiberas enbart i potatisknölar, används promotorer som är specifikt verksamma i potatisknölen. Härigenom påverkas inte stärkelsesammansättningen i andra delar av växten, 25 vilket annars skulle kunna ge negativa bieffekter.

- Uppfinningen omfattar således ett fragment som har i huvudsak någon av de nukleotidsekvenser som anges i SEQ ID nr 1, SEQ ID nr 2 eller SEQ ID nr 3. Sekvenserna kan dock avvika från de angivna med något eller några ej intill 30 varandra liggande baspar utan att fragmentens funktion påverkas.

Uppfinningen omfattar även en potatisknölspecifik promotor omfattande 987 bp, vilken promotor hör till genen enligt uppfinnningen som kodar för stärkelsekornbundet stärkelsesyntas. Varken promotorn eller tillhörande gen 5 har tidigare karakteriseras. Promotorns sekvens av 987 bp är angiven i SEQ ID nr 4 medan genens sekvens är angiven i SEQ ID nr 5. Även promotorns och genens sekvenser kan avvika från de angivna med något eller några ej intill varandra liggande baspar, utan att deras funktion 10 påverkas.

Uppfinningen omfattar likaså vektorer vilka inbegriper antisens-fragmenten respektive antisens-konstruktionerna enligt uppfinnningen.

I andra aspekter omfattar uppfinnningen celler, plan- 15 tor, knölar, mikroknölar respektive frön, vilkas genom innehåller fragmenten enligt uppfinnningen insatta i antisens-riktning.

I ytterligare andra aspekter omfattar uppfinnningen stärkelse av amylopektintyp, både nativ och derivatiserad. 20

Slutligen omfattar uppfinnningen ett förfarande för undertryckande av amylosbildning i potatis, varigenom huvudsakligen stärkelse av amylopektintyp bildas i potatisen.

Uppfinningen beskrivs närmare med hjälp av bifogade 25 figurer, vari

fig 1 visar principen för antisens-geninhibering;

fig 2 visar resultatet av restriktionsanalys av potatis-GBSS-genen;

fig 3 visar två nya binära vektorer pHo3 och pHo4;

30 fig 4 visar antisens-konstruktionerna pHoxwA, pHoxwB och pHoxwD;

fig 5 visar antisens-konstruktionerna pHoxwF och pHoxwG;

35 fig 6 visar antisens-konstruktionerna pHoxwK och pHoxwL.

Dessutom visas sekvenserna för de olika DNA-fragmenten enligt uppförandet i SEQ ID nr 1, 2, 3, 4 och 5. Avvikelser från dessa sekvenser kan förekomma i något eller några ej intill varandra liggande baspar.

5 MATERIAL

Vid det praktiska genomförandet av uppförandet har följande material använts:

Bakteriestammar: E. coli DH5^{alpha} och DH5^{alpha}F' IQ(BRL). E. coli JM105 (Pharmacia). A. tumefaciens LBA4404 (Clontech).

10 Vektorer: M13mp18 och mp19 (Pharmacia). pBI101 och pBI121 (Clontech). pBI240.7 (M. W. Bevan). pUC plasmider (Pharmacia).

Enzymer: Restriktionsenzymer och EcoRI linker (BRL).

UNIONTM DNA Ligation Kit (Clontech). SequenaseTM DNA

15 Sequencing Kit (USB). T₄-DNA ligas (Pharmacia).

Ovan angivna material används i enlighet med av tillverkarna angivna specifikationer.

Genomiskt bibliotek

Ett genomiskt bibliotek i EMBL3 har producerats av

20 Clontech för sökandens räkning med blad av potatissorten Bintje som utgångsmaterial.

Identifiering och isolering av GBSS-genen

Det genomiska biblioteket har screenats för potatis-GBSS-genen med hjälp av cDNA-kloner för såväl 5'-som

25 3'-änden av genen (vilka cDNA-kloner erhållits från M Hergersberger, Max Plankinstitutet i Köln) i enlighet med protokoll från Clontech.

En fullängdsklon av potatis-GBSS-genen wx311 har identifierats och isolerats ur det genomiska biblioteket.

30 Början av GBSS-genen har bestämts till ett EcoRI-fragment och kallas fragment w (3,95 kb). Slutet av GBSS-genen har också bestämts till ett EcoRI-fragment, vilket kallas fragment x (5,0 kb). Ett BgIII-SpeI fragment, vilket kallas fragment m (3,9 kb), har också isolerats; detta fragment delar sekvenser från såväl fragment w som fragment x.

35 Fragmenten w, m och x har subklonats i pUC13 (Viera, 1982; Yanisch-Peron et al, 1985) och betecknas pSw, pSm respektive pSx (fig 2).

Karakterisering av GBSS-genen i potatis

GBSS-genen i potatis har karakteriserats med hjälp av restriktionsanalys och cDNA-prober, varvid 5'- och 3'-änden av GBSS-genen bestämts noggrannare (fig 2). Sekvensbestämning enligt Sanger et al, 1977, av GBSS-genen har gjorts på subkloner från pSw och pSx i M13mp18 och mp19 samt pUC19 med start kring 5'-änden (se SEQ ID nr 5).

Promotorregionen är bestämd till ett BglII-NsiI-fragment (se SEQ ID nr 4). Transkriptions- och translationsstart har bestämts till ett överlappande BglII-HindIII-fragment. Terminatorregionen i sin tur är bestämd till ett SpeI-HindIII-fragment.

Antisens-konstruktioner för GBSS-genen i potatis

GBSS-genfragmenten enligt uppförningen (se SEQ ID nr 1, 2 och 3 och fig 2) har bestämts på följande sätt.

Restriktion av pSw med NsiI och HindIII ger fragment I (SEQ ID nr 1), som subklonat i pUC19 kallas 19NH35. Vidare restriktion av 19NH35 med HpaI-SstI ger ett fragment innehållande 342 bp av GBSS-genen enligt uppförningen. Detta fragment består av ledarsekvens, translationsstart samt de första 125 bp av den kodande regionen.

Restriktion av pSm med HpaI och NsiI ger fragment II (SEQ ID nr 2), som subklonat i pJRD184 (Heusterspreute et al, 1987) kallas pJRDmitt. Vidare restriktion av pJRDmitt med HpaI-SstI ger ett fragment som innehåller 2549 bp av GBSS-genen enligt uppförningen. Detta fragment består av exoner och introner ur mittdelen av genen.

Restriktion av pSx med SstI och SpeI ger fragment III (SEQ ID nr 3) som subklonat i pBluescript (Melton et al, 1984) kallas pBlue3'. Vidare restriktion av pBlue3' med BamHI-SstI ger ett fragment som innehåller 492 bp av GBSS-genen enligt uppförningen. Detta fragment består av sista intron och exon, translationsslut samt 278 bp av trailersekvens.

Antisens-konstruktioner med fragment I (fig 4): För antisens-konstruktionen pHoxwA har HpaI-SstI fragmentet från 19NH35 insatts i antisens-riktnings i den binära vektor

204

pBI121 (Jefferson et al, 1987) klyvd med SmaI-SstI. Transkriptionen av antisens-fragmentet initieras då av CaMV 35S-promotorn och termineras av NOS-terminatorn (NOS = nopalinsyntas).

- 5 För antisens-konstruktionen pHoxwB har HpaI-SstI fragmentet från 19NH35 insatts i antisens-riktning i den binära vektorn pHo4 (fig 3) klyvd med SmaI-SstI. Patatin I promotorn, som är knölspecifik i potatis, kommer från vektorn pBI240.7, erhållen från M. Bevan, Institute of Plant
10 Science Research i Norwich. Transkriptionen av antisens-fragmentet initieras då av patatin I-promotorn och termineras av NOS-terminatorn.

För antisens-konstruktionen pHoxwD har HpaI-SstI fragmentet från 19NH35 insatts i antisens-riktning i den
15 binära vektorn pHo3 (fig 3) klyvd med SmaI-SstI. pHo3 är en ny binär vektor som konstruerats utgående från pBI101. Denna vektor, som innehåller promotorn enligt uppfinningen (se SEQ ID nr 4) (GBSS-promotorn) till den nu karakteriseraade potatis-GBSS-genen enligt uppfinningen, har restriktionsklyvts med SmaI och SstI, varvid HpaI-SstI-fragmentet från 19NH35 insatts i antisens-riktning. Transkriptionen
20 av antisens-fragmentet initieras då av den egna GBSS-promotorn och termineras av NOS-terminatorn. Detta innebär att antisens-fragmentet transkriberas enbart i potatisknölen, eftersom GBSS-promotorn i likhet med patatin I-promotorn är knölspecifik.

Antisens-konstruktioner med fragment II (fig 5): För antisens-konstruktionen pHoxwF har HpaI-SstI fragmentet från pJRDmitt insatts i antisens-riktning i den binära vektorn pHo4 klyvd med SmaI-SstI. Transkriptionen av antisens-fragmentet initieras då av patatin I-promotorn och termineras av NOS-terminatorn.

För antisens-konstruktionen pHoxwG har HpaI-SstI fragmentet från pJRDmitt insatts i antisens-riktning i den
35 binära vektorn pHo3 klyvd med SmaI-SstI. Transkriptionen av antisens-fragmentet initieras då av den egna GBSS-promotorn och termineras av NOS-terminatorn.

Antisens-konstruktioner med fragment III (fig 6): För antisens-konstruktionen pHoxwK har BamHI-SstI fragmentet från pBlue3' insatts i antisens-riktning i den binära vektorn pHo4 klyvd med BamHI-SstI. Transkriptionen av antisens-fragmentet initieras då av patatin I-promotorn och termineras av NOS-terminatorn.

För antisens-konstruktionen pHoxwL har BamHI-SstI fragmentet från pBlue3' insatts i antisens-riktning i den binära vektorn pHo3 klyvd med BamHI-SstI. Transkriptionen av antisens-fragmentet initieras då av den egna GBSS-promotorn och termineras av NOS-terminatorn.

De bildade antisens-konstruktionerna (fig 4, 5, 6) har transformerats till Agrobacterium tumefaciens stam LBA4404 genom direkt transformation med "frys-upptinings"-metoden (Hoekema et al, 1983; An et al, 1988).

Transformation

Antisens-konstruktionerna överförs till bakterier, lämpligen medelst "frys-upptiningsmetoden" (An et al, 1988). Överföringen av den rekombinanta bakterien till potatisvävnad sker genom inkubation av potatisvävnaden med den rekombinanta bakterien i lämpligt medium efter det att någon form av skada tillförts potatisvävnaden. Under inkuberingen går T-DNA från bakterien in i värdväxtens DNA. Efter inkuberingen dödas bakterierna och potatisvävnaden överförs på fast medium för kallusinduktion och inkuberas för kallustillväxt.

Efter lämpliga passager genom ytterligare medier bildas skott, vilka skärs bort från potatisvävnaden.

Kontroller för test av antisens-konstruktionernas expression samt överföring till potatisgenomet utförs med exempelvis southern och northern hybridisering (Maniatis et al (1982)). Antalet kopior av antisens-konstruktionen som överförts bestäms med southern hybridisering.

Kontrollen av expressionen på proteinnivå utförs lämpligen på mikroknölar inducerade in vitro på de transformeraade skotten för att man så snabbt som möjligt skall kunna genomföra kontrollen.

Karakterisering av GBSS-proteinet

Antisens-konstruktionernas inverkan på GBSS-genens funktion med avseende på GBSS-proteinets aktivitet undersöks genom att stärkelse utvinnes ur mikroknörlarna och 5 analyseras med avseende på närvaron av GBSS-proteinet. Vid elektrofores på polyakrylamidgel (Hovenkamp-Hermelink et al, 1987) bildar GBSS-proteinet ett distinkt band vid 60 kD då GBSS-genen är i funktion. Då GBSS-genen inte uttrycks, dvs då antisens-GBSS-genen uttrycks i full uttryckning så att bildningen av GBSS-protein inhiberas, 10 påvisas inget 60 kD-band på gelen.

Karakterisering av stärkelsen

Stärkelsesammanställningen i mikroknölar är identisk med den i vanliga potatisknölar och därfor kan antisens-15-konstruktionernas inverkan på amylosproduktionen undersökas i mikroknölar. Förhållandet mellan amylos och amylopektin kan bestämmas med en spektrofotometrisk metod (t ex enligt Hovenkamp-Hermelink et al, 1988).

Utvinnning av amylopektin ur amylopektinpottatis

20 Amylopektinet utvinns ur den s k amylopektinpottatisen (potatis vari bildningen av amylos har undertryckts genom införandet av antisens-konstruktionerna enligt uppfindingen) på känt sätt.

Derivatisering av amylopektin

25 Beroende på amylopektinets slutliga användning kan dess fysikaliska och kemiska egenskaper förändras genom derivatisering. Med derivatisering avses här såväl kemisk som fysikalisk och enzymatisk behandling samt kombinationer av dessa (Modified starches).

30 Den kemiska derivatiseringen, dvs kemisk förändring av amylopektinet, kan ske på olika sätt, exempelvis genom oxidation, syrahydrolysis, dextrinisering, olika former av förestring, t ex katjonisering, hydroxipropylering och hydroxyetylering, olika former av förestring, t ex med vinylacetat, ätiksyranshydrid, eller genom monofosfatering, difosfatering och oktenylsuccinering, samt kombinationer av dessa.

Fysikalisk förändring av amylopektinet, kan exempelvis åstadkommjas genom valstorkning eller extrudering.

Vid enzymatisk derivatisering utförs en nedbrytning (minskning av viskositeten) och kemisk modifiering av amylopektinet med hjälp av förekommande enzymatiska system.

Derivatiseringen genomförs vid olika temperaturer, allt efter vilken slutprodukt man önskar framställa. Det vanliga temperaturområdet som man arbetar inom är 20-45°C, men temperaturer upp till 180°C kan användas.

10 Uppfinningen beskrivs närmare i följande exempel.

Exempel 1

Framställning av mikroknölar med insatta antisens-konstruktioner enligt uppföringen

15 Antisens-konstruktionerna (se fig 4, 5 och 6) överförs till Agrobacterium tumefaciens LBA 4404 med hjälp av "frys-upptiningsmetoden" (An et al, 1988). Överföringen till potatisvävnad utförs enligt ett modifierat protokoll enligt Rocha-Sosa et al (1989).

Bladdiskar från potatisplantor odlade in vitro inkuberas i mörker på flytande MS-medium (Murashige & Skoog; 1962) med 3% sackaros och 0,5% MES tillsammans med 100 µl av en suspension av rekombinant Agrobacterium per 10 ml medium i två dygn. Efter dessa två dygn dödas bakterierna. Bladdiskarna överförs på fast medium för kallusinduktion 25 och inkuberas i 4-6 veckor beroende på kallustillväxt. Det fasta mediet har följande sammansättning:

MS + 3% sackaros

2 mg/l zeatinribosid

0,02 mg/l "NAA"

30 0,02 mg/l "GA₃"

500 mg/l "Claforan"

50 mg/l kanamycin

0,25% "Gellan"

Härefter överförs bladdiskarna till ett medium med 35 annan hormonsammansättning, omfattande:

MS + 3% sackaros

5 mg/l "NAA"

0,1 mg/l "BAP"

500 mg/l "Claforan"

5 50 mg/l kanamycin

0,25% "Gellan"

Bladdiskarna förvaras på detta medium i ca 4 veckor, varefter de överförs till ett medium där "Claforan"-koncentrationen reducerats till 250 mg/l. Om det behövs flyt-

10 tas bladdiskarna därefter över till färskt medium var 4:e till 5:e vecka. Efter skottbildning skärs skotten bort från bladdiskarna och överförs till ett identiskt medium.

Att antisens-konstruktionen har överförts till bladdiskarna kontrolleras först genom att bladextrakt från de 15 regenererade skotten analyseras med avseende på glukuronidasaktivitet med de substrat som beskrivits av Jefferson et al (1987). Aktiviteten påvisas genom visuell bedömning.

Ytterligare kontroller av antisens-konstruktionernas expression samt överföring därav till potatisgenomet ut- 20 förs med southern och northern hybridisering enligt Maniatis et al (1981). Antalet kopior av antisens-konstruktionerna som överförts bestäms med southern hybridisering.

När det konstaterats att antisens-konstruktionerna överförts till och uttryckts i potatisgenomet vidtar kont- 25 rollen av expressionen på proteinnivå. För att inte behöva vänta på utvecklingen av en fullständig potatisplanta med potatisknölar utförs kontrollen på mikroknölar som inducerats in vitro på de transformeraade skotten.

Stambitar av potatisskotten klipps av vid noderna och 30 placeras på modifierat MS-medium. Där bildar de mikroknölar efter 2-3 veckor vid inkubering i mörker vid 19°C (Bourque et al, 1987). Mediet har följande sammansättning:
MS + 6% sackaros

2,5 mg/l kinetin

35 2,5 mg/l "Gellan"

Antisens-konstruktionernas inverkan på GBSS-genens funktion med avseende på GBSS-proteinets aktivitet analyseras med hjälp av elektrofores på polyakrylamidgel (Hovenkamp-Hermelink et al, 1987). Stärkelse utvinns ur mikroknörlarna och analyseras med avseende på närvaren av GBSS-proteinet. I en polyakrylamidgel bildar GBSS-proteinet ett distinkt band vid 60 kD då GBSS-genen är i funktion. Om GBSS-genen inte uttrycks, dvs då antisens-GBSS-genen uttrycks till fullo så att bildningen av GBSS-protein inhiberas, kan man inte se något 60 kD-band på gelen.

Stärkelsesammansättningen, dvs förhållandet mellan amylos och amylopektin, bestäms med en spektrofotometrisk metod enligt Hovenkamp-Hermelink et al (1988), varvid halten av respektive stärkelsekomponent bestäms utifrån en standardkurva.

Exempel 2

Utvinnning av amylopektin ur amylopektinpotatis

Potatis, vars huvudsakliga stärkelsekomponent utgörs av amylopektin, här kallad amylopektinpotatis, gentekniskt förändrad enligt uppförningen, rivs så att stärkelsen friläggs från cellväggarna.

Cellväggarna (fibrerna) avskiljs från fruktsaft och stärkelse i centrisiler. Fruktsaften avskiljs från stärkelsen i två steg, nämligen först i hydrocykloner och där efter i speciellt konstruerade vakuumbandfilter.

Därefter utförs en slutraffinering i hydrocykloner, där resten av fruktsaften och fibrerna avskiljs.

Produkten torkas i två steg, först genom en förtorkning på vakuumpfilter och därefter en sluttorkning i varmluftström.

Exempel 3

Kemisk derivatisering av amylopektin

Amylopektin uppslammas i vatten till en koncentration av 20-50%. pH-värdet justeras till 10,0-12,0 och en kvar-^{quaternary} 35 tär ammoniumförening tillsätts i en sådan mängd att slutprodukten får en substitutionsgrad av 0,004-0,2. Reaktionstemperaturen inställs till 20-45°C. Då reaktionen är

klar justeras pH-värdet till 4-8, varefter produkten tvättas och torkas. På detta sätt erhålls det katjoniska stärkelsederivatet 2-hydroxi-3-trimethylammoniumpropyleter.

Exempel 4

5 Kemisk derivatisering av amylopektin

Amylopektin uppslammas i vatten till en vattenhalt av 10-25 vikt%. pH-värdet justeras till 10,0-12,0 och en kvartär ammoniumförening tillsätts i en sådan mängd att slutprodukten får en substitutionsgrad av 0,004-0,2. Reaktionstemperaturen inställs på 20-45°C. Då reaktionen är klar justeras pH-värdet till 4-8. Slutprodukten är 2-hydroxi-3-trimethylammoniumpropyleter.

Exempel 5

Kemisk derivatisering av amylopektin

15 Amylopektin uppslammas i vatten till en koncentration av 20-50 vikt%. pH-värdet justeras till 5,0-12,0 och natriumhypoklorit tillsätts så att slutprodukten får önskad viskositet. Reaktionstemperaturen inställs på 20-45°C. Då reaktionen är klar justeras pH-värdet till 4-8, varefter 20 slutprodukten tvättas och torkas. På detta sätt erhålls oxiderad stärkelse.

Exempel 6

Fysikalisk derivatisering av amylopektin

Amylopektin uppslammas i vatten till en koncentration av 20-50 vikt%, varefter uppslamningen anbringas på en uppvärmd vals, där den torkas till en film.

Exempel 7

Kemisk och fysikalisk derivatisering av amylopektin

Amylopektin behandlas enligt de förfaranden som beskrivs i något av exemplen 3-5 för kemisk modifiering och behandlas därefter vidare enligt exempel 6 för fysikalisk derivatisering.

Litteraturreferenser:

- Mac Donald, F. D. och Preiss, J., 1985, Plant. Physiol. 78:849-852
- Preiss, J., 1988, In The Biochemistry of Plants 14
- 5 (Carbohydrates). Ed. J. Preiss, Academic Press; 181-254
- Echt, C. S. och Schwarz, D., 1981, Genetics 99:275-284
- Klösgen, R. B., Gierl, A., Schwarz-Sommer, Z. och Saedler, H., 1986, Mol. Gen. Genet. 203:237-244
- Schwarz-Sommer, Z., Gierl, A., Klösgen, R. B., Wienand, 10 U., Peterson, P. A. och Saedler, H., 1984, EMBO J. 3(5):1021-1028
- Shure, M., Wessler, S. och Fedoroff, N., 1983, Cell 35:225-233
- Jacobsen, E., Kriggsheld, H. T., Hovenkamp-Hermelink, J.
- 15 H. M., Ponstein, A. S., Witholt, B. och Feenstra, W. J., 1990, Plant. Sci. 67:177-182
- Visser, R. G. F., Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., Ponstein, A. S., Vos-Scheperskeuter, G. H., Jacobsen, E., Feenstra, W. J. och Witholt, B., 1987, Proc. 4th European 20 Congress on Biotechnology 1987, vol 2, Elsevier, Amsterdam; 432-435
- Vos-Scheperskeuter, G. H., De Boer, W., Visser, R. G. F., Feenstra, W. J. och Witholt, B., 1986, Plant. Physiol. 82:411-416
- 25 - Cornelissen, M., 1989, Nucleic Acids Res. 17(18):7203-7209
- Izant, J. G., 1989, Cell Motility and Cytoskeleton 14:81-91
- Sheehy, R. E., Kramer, M., Hiatt, W. R., 1988, Proc.
- 30 Natl. Acad. Sci. USA, 85(23):8805-8809
- Van der Krol, A. R., Mur, L. A., de Lange, P., Gerats, A. G. M., Mol, J. N. M. och Stuitje, A. R., 1960, Mol. Gen. Genet. 220:204-212
- Flavell, R. B., 1990, AgBiotech. News and Information 35 2(5):629-630
- Hergersberger, M., 1988, Molekulare Analyse des waxy Gens aus Solanum tuberosum und Expression von waxy

- antisense RNA in transgenen Kartoffeln. Doktorsavhandling från Universitetet i Köln.
- Visser, R. G. F., Hergersberger, M., van der Leij, F. R., Jacobsen, E., Witholt, B. och Feenstra, W. J., 1989,
- 5 Plant. Sci. 64:185-192
- An, G., Ebert, P. R., Mitra, A. och Ha, S. B., 1987, Plant Mol. Biol. Manual A3:1-19
 - Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. och Schilperoort, R. A., 1983, Nature 303:179-180
- 10 - Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. och Bevan, M. W., 1987, EMBO J. 6:3201-3207
- Sanger, F., Nicklen, S. och Coulson, A. R., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467
 - Viera, J. och Messing, J., 1982, Gene 19:259-268
- 15 - Yanisch-Perron, C., Viera, J. och Messing, J., 1985, Gene 33:103-119
- Heusterspreute et al (1987) Gene 53:294-300
 - Melton, D. A. et al (1984), Nucleic Acids Res. 12:7035-7056 (plasmiden säljs av Stratagene)
- 20 - Murashige, T. och Skoog, F., 1962, Physiol. Plant 15:473-497.
- Rocha-Sosa, M., Sonnewald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Shell, J. och Willmitzer, L., 1989, EMBO J., 8(1):23-29
- 25 - Jefferson, R. A., Kavanagh, R. A. och Bevan, M. W., 1987, EMBO J. 6:3901-3907
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. och Sambrook, J., 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- 30 - Bourque, J. E., Miller, J. C. och Park, W. D., 1987, In Vitro Cellular & Development Biology 23(5):381-386
- Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., Jacobsen, E., Ponstein, A. S., Visser, R. G. F., Vos-Scheperkeuter, G. H., Bijmolt, E. W., de Vries, J. N., Witholt, B. J. &
- 35 Feenstra, W. J., 1987, Theor. Appl. Genet. 75:217-221
- Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., de Vries, J. N., Adamse, P., Jacobsen, E., Witholt, B. och Feenstra, W. J., 1988,

18

Potato Research 31:241-246

- Modified starches: Properties and use D. B. Wurzburg
- Bevan, M. W., 1984. Nucleic Acids Res. 12:8711-8721.

5

10

15

20

25

30

35

214

19

SEQ ID nr 1

Sekvenserad molekyl: genomiskt DNA

Namn: GBSS-genfragment från potatis

Sekvenslängd: 342 bp

TGCATGTTTC	CCTACATTCT	ATTTAGAAC	GTGTTGTGGT	GTATAAACGT	50
TGTTTCATAT	CTCATCTCAT	CTATTCTGAT	TTTGATTCTC	TTGCCTACTG	100
TAATCGGTGA	TAAATGTGAA	TGCTTCCTTT	CTTCTCAGAA	ATCAATTCT	150
GTTTTGTTTT	TGTTCATCTG	TAGCTTATTTC	TCTGGTAGAT	TCCCCTTTT	200
GTAGACCACA	CATCAC	ATG GCA AGC	ATC ACA GCT	TCA CAC CAC	243
		Met Ala Ser Ile	Thr Ala Ser His	His	
		1	5		
TTT GTG TCA AGA AGC CAA ACT	TCA CTA GAC ACC	AAA TCA ACC			285
Phe Val Ser Arg Ser Gln Thr	Ser Leu Asp Thr	Lys Ser Thr			
10	15	20			
TTG TCA CAG ATA GGA CTC AGG AAC	CAT ACT CTG ACT CAC AAT				327
Leu Ser Gln Ile Gly Leu Arg	Asn His Thr Leu Thr	His Asn			
25	30	35			
GGT TTA AGG GCT GTT					342
Gly Leu Arg Ala Val					
40					

20

25

30

35

215

SEQ ID nr 2

Sekvenserad molekyl: genomiskt DNA

Namn: GBSS-genfragment från potatis

Sekvenslängd: 2549 bp

AAC AAG CTT GAT GGG CTC CAA TCA ACA ACT AAT ACT AAG GTA Asn Lys Leu Asp Gly Leu Gln Ser Thr Thr Asn Thr Lys Val 45 50 55	42
ACA CCC AAG ATG GCA TCC AGA ACT GAG ACC AAG AGA CCT GGA Thr Pro Lys Met Ala Ser Arg Thr Glu Thr Lys Arg Pro Gly 60 65 70	84
TGC TCA GCT ACC ATT GTT TGT GGA AAG GGA ATG AAC TTG ATC Cys Ser Ala Thr Ile Val Cys Gly Lys Gly Met Asn Leu Ile 75 80	126
TTT GTG GGT ACT GAG GTT GGT CCT TGG AGC AAA ACT GGT GGA Phe Val Gly Thr Glu Val Gly Pro Trp Ser Lys Thr Gly Gly 85 90 95	168
CTA GGT GAT GTT CTT GGT GGA CTA CCA CCA GCC CTT GCA Leu Gly Asp Val Leu Gly Leu Pro Pro Ala Leu Ala 100 105 110	207
GTAAGTCTTT CTTCATTG GTTACCTACT CATTCAATTAC TTATTTGTT TAGTTAGTTT CTACTGCATC AGTCTTTTA TCATTTAG GCC CGC GGA Ala Arg Gly	257 304
CAT CGG GTA ATG ACA ATA TCC CCC CGT TAT GAC CAA TAC AAA His Arg Val Met Thr Ile Ser Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys 115 120 125	346
GAT GCT TGG GAT ACT GGC GTT GCG GTT GAG GTACATCTTC Asp Ala Trp Asp Thr Gly Val Ala Val Glu	386
130 135	
CTATATTGAT ACGGTACAAT ATTGTTCTCT TACATTTCT GATTCAAGAA TGTGATCATC TGCAG GTC AAA GTT GGA GAC AGC ATT GAA ATT GTT Val Lys Val Gly Asp Ser Ile Glu Ile Val 140 145	436 481
CGT TTC TTT CAC TGC TAT AAA CGT GGG GTT GAT CGT GTT TTT Arg Phe His Cys Tyr Lys Arg Gly Val Asp Arg Val Phe 150 155 160	523
GTT GAC CAC CCA ATG TTC TTG GAG AAA GTAAAGCATAT Val Asp His Pro Met Phe Leu Glu Lys	560
165 170	

TATGATTATG AATCCGTCCT GAGGGATAACG CAGAACAGGT CATTTGAGT ATCTTTAAC TCTACTGGTG CTTTTACTCT TTTAAG GTT TGG GGC AAA Val Trp Gly Lys 175	610 658
ACT GGT TCA AAA ATC TAT GGC CCC AAA GCT GGA CTA GAT TAT Thr Gly Ser Lys Ile Tyr Gly Pro Lys Ala Gly Leu Asp Tyr 180 185	700
CTG GAC AAT GAA CTT AGG TTC AGC TTG TTG TGT CAA Leu Asp Asn Glu Leu Arg Phe Ser Leu Leu Cys Gln 190 195 200	736
GTAAGTTAGT TACTCTTGAT TTTTATGTGG CATTACTC TTTGTCTTT AATCGTTTT TTAACCTTGT TTTCTCAG GCA GCC CTA GAG GCA CCT Ala Ala Leu Glu Ala Pro 205	786 832
AAA GTT TTG AAT TTG AAC AGT AGC AAC TAC TTC TCA GGA CCA Lys Val Leu Asn Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Phe Ser Gly Pro 210 215 220	874
TAT G GTAATTAACA CATCCTAGTT TCAGAAA ACT CCTTACTATA Tyr G	918
TCATTGTAGG TAATCATCTT TATTTGCCT ATTCCGCAG GA GAG GAT ly Glu Asp 225	966
GTT CTC TTC ATT GCC AAT GAT TGG CAC ACA GCT CTC ATT CCT Val Leu Phe Ile Ala Asn Asp Trp His Thr Ala Leu Ile Pro 230 235	1008
TGC TAC TTG AAG TCA ATG TAC CAG TCC AGA GGA ATC TAC TTG Cys Tyr Leu Lys Ser Met Tyr Gln Ser Arg Gly Ile Tyr Leu 240 245 250	1050
AAT GCC AAG GTAAAATTTC TTTGTATTCA CTCGATTGCA Asn Ala Lys 255	1089
CGTTACCCTG CAAATCAGTA AGGTGTATT AATATATGAT AAATTCACA TTGCCTCCAG GTT GCT TTC TGC ATC CAT AAC ATT GCC TAC CAA Val Ala Phe Cys Ile His Asn Ile Ala Tyr Gln 260 265	1139 1182
GGT CGA TTT TCT TTC TCT GAC TTC CCT CTT CTC AAT CTT CCT Gly Arg Phe Ser Phe Ser Asp Phe Pro Leu Leu Asn Leu Pro 270 275 280	1224
GAT GAA TTC AGG GGT TCT TTT GAT TTC ATT GAT GGG TAT Asp Glu Phe Arg Gly Ser Phe Asp Phe Ile Asp Gly Tyr 285 290	1263
GTATTTATGC TTGAAATCAG ACCTCCAAC TTTGAAGCTC TTTGATGCT	1313

CAG GAG ATT GAA CAG CTC GAA GTG TTG TAC CCT AAC AAA GCT Gln Glu Ile Glu Gln Leu Glu Val Leu Tyr Pro Asn Lys Ala 445 450	2010
AAA GGA GTG GCA AAA TTC AAT GTC CCT TTG GCT CAC ATG ATC Lys Gly Val Ala Lys Phe Asn Val Pro Leu Ala His Met Ile 455 460 465	2052
ACT GCT GGT GCT GAT TTT ATG TTG GTT CCA AGC AGA TTT GAA Thr Ala Gly Ala Asp Phe Met Leu Val Pro Ser Arg Phe Glu 470 475 480	2094
CCT TGT GGT CTC ATT CAG TTA CAT GCT ATG CGA TAT GGA ACA Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu His Ala Met Arg Tyr Gly Thr 485 490 495	2136
GTAAGAACCA GAAGAGCTTG TACCTTTTA CTGAGTTTTT AAAAAAGAA TCATAAGACC TTGTTTCCA TCTAAAGTTT AATAACCAAC TAAATGTTAC TGCAGCAAGC TTTTCATTTC TGAAAATTGG TTATCTGATT TTAACGTAAT CACATGTGAG TCAG GTA CCA ATC TGT GCA TCG ACT GGT GGA CTT Val Pro Ile Cys Ala Ser Thr Gly Gly Leu 500 505	2186 2236 2286 2330
GTT GAC ACT GTG AAA GAA GGC TAT ACT GGA TTC CAT ATG GGA Val Asp Thr Val Lys Glu Gly Tyr Thr Gly Phe His Met Gly 510 515 520	2372
GCC TTC AAT GTT GAA GTATGTGATT TTACATCAAT TGTGTACTTG Ala Phe Asn Val Glu 525	2417
TACATGGTCC ATTCTCGTCT TGATATACCC CTTGTTGCAT AAACATTAAC TTATTGCTTC TTGAATTTGG TTAG TGC GAT GTT GTT GAC CCA GCT Cys Asp Val Val Asp Pro Ala 530	2467 2512
GAT GTG CTT AAG ATA GTA ACA ACA GTT GCT AGA GCT C Asp Val Leu Lys Ile Val Thr Thr Val Ala Arg Ala 535 540	2549

SEQ ID nr 3

Sekvenserad molekyl: genomiskt DNA

Namn: GBSS-genfragment från potatis

Sekvenslängd: 492 bp

GAG CTC TCC TGG AAG	GTAAGTGTGA ATTTGATAAT TTGCGTAGGT	45
Glu Leu Ser Trp Lys		
565		
ACTTCAGTTT GTTGTTCTCG TCAGCACTGA TGGATTCCAA CTGGTGTTCT		95
TGCAG GAA CCT GCC AAG AAA TGG GAG ACA TTG		127
Glu Pro Ala Lys Lys Trp Glu Thr Leu		
570 575		
CTA TTG GGC TTA GGA GCT TCT GGC AGT GAA CCC GGT GTT GAA		169
Leu Leu Gly Leu Gly Ala Ser Gly Ser Glu Pro Gly Val Glu		
580 585 590		
GGG GAA GAA ATC GCT CCA CTT GCC AAG GAA AAT GTA GCC ACT		211
Gly Glu Glu Ile Ala Pro Leu Ala Lys Glu Asn Val Ala Thr		
595 600 605		
CCT TAA ATGAGCTTTG GTTATCCTTG TTTCAACAAT AAGATCATTA		257
Pro ***		
606		
AGCAAACGTA TTTACTAGCG AACTATGTAG AACCTATTAA TGGGGTCTCA		307
ATCATCTACA AAATGATTGG TTTTGCTGG GGAGCAGCAG CATATAAGGC		357
TGTAAAATCC TGGTTAACGT TTTTGTAGGT AAGGGCTATT TAAGGTGGTG		407
TGGATCAAAG TCAATAGAAA ATAGTTATTAA CTAACGTTG CAACTAAATA		457
CTTAGTAATG TAGCATAAAAT AATACTAGAA CTAGT		492

230

SEQ ID nr 4

Sekvenserad molekyl: genomiskt DNA

Namn: Promotor till GBSS-genen från potatis

Sekvenslängd: 987 bp

AAGCTTTAAC	GAGATAGAAA	ATTATGTTAC	TCCGTTTGT	TCATTACTTA	50
ACAAATGCAA	CAGTATCTTG	TACCAAATCC	TTTCTCTCTT	TTCAAACTTT	100
TCTATTGGC	TGTTGACGGA	GTAATCAGGA	TACAAACCAC	AAGTATTAA	150
TTGACTCCCTC	CGCCAGATAT	TATGATTTAT	GAATCCTCGA	AAAGCCTATC	200
CATTAAGTCC	TCATCTATGG	ATATACTTGA	CAGTATCTTC	CTGTTGGGT	250
ATTTTTTTT	CCTGCCAAGT	GGAACGGAGA	CATGTTATGA	TGTATACGGG	300
AAGCTCGTTA	AAAAAAAATA	CAATAGGAAG	AAATGTAACA	AACATTGAAT	350
GTTGTTTTA	ACCATCCTTC	CTTAGCAGT	GTATCAATT	TGTAATAGAA	400
CCATGCATCT	CAATCTTAAT	ACTAAAATGC	AACTTAATAT	AGGCTAAACC	450
AAGATAAAGT	AATGTATTCA	ACCTTTAGAA	TTGTGCATTC	ATAATTAGAT	500
CTTGTGTC	GTAAAAAATT	AGAAAATATA	TTTACAGTAA	TTTGAATAC	550
AAAGCTAAGG	GGGAAGTAAC	TAATATTCTA	GTGGAGGGAG	GGACCAAGTAC	600
CAGTACCTAG	ATATTATTTT	TAATTACTAT	AATAATAATT	TAATTAACAC	650
GAGACATAGG	AATGTCAAGT	GGTAGCGTAG	GAGGGAGTTG	GTTCAGTTTT	700
TTAGATACTA	GGAGACAGAA	CCGGACGGCC	CATTGCAAGG	CCAAGTTGAA	750
GTCCAGCCGT	GAATCAACAA	AGAGAGGGCC	CATAATACTG	TCGATGAGCA	800
TTTCCCTATA	ATACAGTGTC	CACAGTTGCC	TTCTGCTAAG	GGATAGCCAC	850
CCGCTATTCT	CTTGACACGT	GTCACTGAAA	CCTGCTACAA	ATAAGGCAGG	900
CACCTCCTCA	TTCTCACTCA	CTCACTCACA	CAGCTCAACA	AGTGGTAACT	950
TTTACTCATC	TCCTCCAATT	ATTCTGATT	TCATGCA		987

221

SEQ ID nr 5

Sekvenserad molekyl: genomiskt DNA

Namn: GBSS-genen från potatis

Sekvenslängd: 4964 bp

AAGCTTTAAC	GAGATAGAAA	ATTATGTTAC	TCCGTTTGT	TCATTACTTA	50
ACAAATGCAA	CAGTATCTG	TACCAAATCC	TTTCTCTCTT	TTCAAACCTT	100
TCTATTTGGC	TGTTGACGGA	GTAATCAGGA	TACAAACCAC	AAGTATTTAA	150
TTGACTCCCTC	CGCCAGATAT	TATGATTTAT	GAATCCTCGA	AAAGCCTATC	200
CATTAAGTCC	TCATCTATGG	ATATACTTGA	CAGTATCTTC	CTGTTGGGT	250
ATTTTTTTT	CCTGCCAAGT	GGAACGGAGA	CATGTTATGA	TGTATACGGG	300
AAGCTCGTTA	AAAAAAAATA	CAATAGGAAG	AAATGTAACA	AACATTGAAT	350
GTGTTTTTA	ACCATCCTTC	CTTAGCAGT	GTATCAATT	TGTAATAGAA	400
CCATGCATCT	CAATCTTAAT	ACTAAAATGC	AACTTAATAT	AGGCTAAACC	450
AAGATAAAAGT	AATGTATTCA	ACCTTTAGAA	TTGTCATTC	ATAATTAGAT	500
CTTGTGGTC	GTAAAAAATT	AGAAAATATA	TTTACAGTAA	TTTGGAAATAC	550
AAAGCTAAGG	GGGAAGTAAC	TAATATTCTA	GTGGAGGGAG	GGACCAGTAC	600
CAGTACCTAG	ATATTATTT	TAATTACTAT	AATAATAATT	TAATTAACAC	650
GAGACATAGG	AATGTCAAGT	GGTAGCGTAG	GAGGGAGTTG	GTTAGTTTT	700
TTAGATACTA	GGAGACAGAA	CCGGACGGCC	CATTGCAAGG	CCAAGTTGAA	750
GTCCAGCCGT	GAATCAACAA	AGAGAGGGCC	CATAATACTG	TCGATGAGCA	800
TTTCCCTATA	ATACAGTGTC	CACAGTTGCC	TTCTGCTAAG	GGATAGGCCAC	850
CCGCTATTCT	CTTGACACGT	GTCACTGAAA	CCTGCTACAA	ATAAGGCAGG	900
CACCTCCTCA	TTCTCACTCA	CTCACTCACA	CAGCTCAACA	AGTGGTAAC	950
TTTACTCATC	TCCTCCAATT	ATTCTGATT	TCATGCATGT	TTCCCTACAT	1000
TCTATTATGA	ATCGTGTGT	GGTGTATAAA	CGTTGTTCA	TATCTCATCT	1050
CATCTATTCT	GATTTTGATT	CTCTTGCCTA	CTGTAATCGG	TGATAATGT	1100
GAATGCTTCC	TTTCTTCTCA	GAATCAATT	TCTGTTTGT	TTTGTTCAT	1150
CTGTAGCTTA	TTCTCTGGTA	GATTCCCCTT	TTTGTAGACCC	ACACATCAC	1199
ATG GCA AGC ATC ACA GCT TCA CAC CAC TTT GTG	TCA AGA AGC				1241
Met Ala Ser Ile Thr Ala Ser His His Phe Val	Ser Arg Ser				
1	5	10			
CAA ACT TCA CTA GAC ACC AAA TCA ACC TTG TCA CAG ATA GGA					1283
Gln Thr Ser Leu Asp Thr Lys Ser Thr Leu Ser Gln Ile Gly					
15	20	25			
CTC AGG AAC CAT ACT CTG ACT CAC AAT GGT TTA AGG GCT GTT					1325
Leu Arg Asn His Thr Leu Thr His Asn Gly Leu Arg Ala Val					
30	35	40			
AAC AAG CTT GAT GGG CTC CAA TCA ACA ACT AAT ACT AAG GTA					1367
Asn Lys Leu Asp Gly Leu Gln Ser Thr Thr Asn Thr Lys Val					
45	50	55			
ACA CCC AAG ATG GCA TCC AGA ACT GAG ACC AAG AGA CCT GGA					1409
Thr Pro Lys Met Ala Ser Arg Thr Glu Thr Lys Arg Pro Gly					
60	65	70			
TGC TCA GCT ACC ATT GTT TGT GGA AAG GGA ATG AAC TTG ATC					1451
Cys Ser Ala Thr Ile Val Cys Gly Lys Gly Met Asn Leu Ile					
75	80				
TTT GTG GGT ACT GAG GTT GGT CCT TGG AGC AAA ACT GGT GGA					1493
Phe Val Gly Thr Glu Val Gly Pro Trp Ser Lys Thr Gly Gly					
85	90	95			

022

CTA GGT GAT GTT CTT GGT GGA CTA CCA CCA GCC CTT GCA Leu Gly Asp Val Leu Gly Gly Leu Pro Pro Ala Leu Ala 100 105 110	1532
GTAAGTCTT CTTCATTTG GTTACCTACT CATTCAATTAC TTATTTGTT TAGTTAGTTT CTACTGCATC AGTCTTTTA TCATTTAG GCC CGC GGA Ala Arg Gly	1582 1629
CAT CGG GTA ATG ACA ATA TCC CCC CGT TAT GAC CAA TAC AAA His Arg Val Met Thr Ile Ser Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys 115 120 125	1671
GAT GCT TGG GAT ACT GGC GTT GCG GTT GAG Asp Ala Trp Asp Thr Gly Val Ala Val Glu 130 135	GTACATCTTC 1711
CTATATTGAT ACGGTACAAT ATTGTTCTCT TACATTCCT GATTCAAGAA TGTGATCATC TGCAG GTC AAA GTT GGA GAC AGC ATT GAA ATT GTT Val Lys Val Gly Asp Ser Ile Glu Ile Val 140 145	1761 1806
CGT TTC TTT CAC TGC TAT AAA CGT GGG GTT GAT CGT GTT TTT Arg Phe Phe His Cys Tyr Lys Arg Gly Val Asp Arg Val Phe 150 155 160	1848
GTT GAC CAC CCA ATG TTC TTG GAG AAA Val Asp His Pro Met Phe Leu Glu Lys 165 170	GTAAGCATAT 1885
TATGATTATG AATCCGTCCT GAGGGATACG CAGAACAGGT CATTGAGT ATCTTTAAC TCTACTGGTG CTTTACTCT TTTAAG GTT TGG GGC AAA Val Trp Gly Lys 175	1935 1983
ACT GGT TCA AAA ATC TAT GGC CCC AAA GCT GGA CTA GAT TAT Thr Gly Ser Lys Ile Tyr Gly Pro Lys Ala Gly Leu Asp Tyr 180 185	2025
CTG GAC AAT GAA CTT AGG TTC AGC TTG TTG TGT CAA Leu Asp Asn Glu Leu Arg Phe Ser Leu Leu Cys Gln 190 195 200	2061
GTAAGTTAGT TACTCTTGAT TTTTATGTGG CATTTCATC TTTGTCTTT AATCGTTTT TTAACCTTGT TTTCTCAG GCA GCC CTA GAG GCA CCT Ala Ala Leu Glu Ala Pro 205	2111 2157
AAA GTT TTG AAT TTG AAC AGT AGC AAC TAC TTC TCA GGA CCA Lys Val Leu Asn Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Phe Ser Gly Pro 210 215 220	2199

TAT G	GTAATTAACA CATCCTAGTT TCAGAAA ACT CCTTACTATA	2243
Tyr G		
TCATTGTAGG TAATCATCTT TATTTGCCT ATTCCGCAG GA GAG GAT	ly Glu Asp	2291
	225	
GTT CTC TTC ATT GCC AAT GAT TGG CAC ACA GCT CTC ATT CCT		2333
Val Leu Phe Ile Ala Asn Asp Trp His Thr Ala Leu Ile Pro		
230	235	
TGC TAC TTG AAG TCA ATG TAC CAG TCC AGA GGA ATC TAC TTG		2375
Cys Tyr Leu Lys Ser Met Tyr Gln Ser Arg Gly Ile Tyr Leu		
240	245	250
AAT GCC AAG	GTAAAATTC TTTGTATTCA CTCGATTGCA	2414
Asn Ala Lys		
255		
CGTTACCCTG CAAATCAGTA AGGTTGTATT AATATATGAT AAATTCACA		2464
TTGCCTCCAG GTT GCT TTC TGC ATC CAT AAC ATT GCC TAC CAA		2507
Val Ala Phe Cys Ile His Asn Ile Ala Tyr Gln		
260	265	
GGT CGA TTT TCT TTC TCT GAC TTC CCT CTT CTC AAT CTT CCT		2549
Gly Arg Phe Ser Phe Ser Asp Phe Pro Leu Leu Asn Leu Pro		
270	275	280
GAT GAA TTC AGG GGT TCT TTT GAT TTC ATT GAT GGG TAT		2588
Asp Glu Phe Arg Gly Ser Phe Asp Phe Ile Asp Gly Tyr		
285	290	
GTATTTATGC TTGAAATCAG ACCTCCA ACT TTTGAAGCTC TTTTGATGCT		2638
AGTAAATTGA GTTTTAAAAA TTTGCAGAT ATGAG AAG CCT GTT AAG		2685
Lys Pro Val Lys		
295		
GGT AGG AAA ATC AAC TGG ATG AAG GCT GGG ATA TTA GAA TCA		2727
Gly Arg Lys Ile Asn Trp Met Lys Ala Gly Ile Leu Glu Ser		
300	305	310
CAT AGG GTG GTT ACA GTG AGC CCA TAC TAT GCC CAA GAA CTT		2769
His Arg Val Val Thr Val Ser Pro Tyr Tyr Ala Gln Glu Leu		
315	320	325
GTC TCT GCT GTT GAC AAG GGA GTT GAA TTG GAC AGT GTC CTT		2811
Val Ser Ala Val Asp Lys Gly Val Glu Leu Asp Ser Val Leu		
330	335	340
CGT AAG ACT TGC ATA ACT GGG ATT GTG AAT GGC ATG GAT ACA		2853
Arg Lys Thr Cys Ile Thr Gly Ile Val Asn Gly Met Asp Thr		
345	350	

CAA GAG TGG AAC CCA GCG ACT GAC AAA TAC ACA GAT GTC AAA Gln Glu Trp Asn Pro Ala Thr Asp Lys Tyr Thr Asp Val Lys 355	360	365	2895
TAC GAT ATA ACC ACT Tyr Asp Ile Thr Thr 370		GTAAGATAAG ATTTTCCGA CTCCAGTATA	2940
TACTAAATTAA TTTTGATGT TTATGAAATT AAAGAGTTCT TGCTAATCAA AATCTCTATA CAG GTC ATG GAC GCA AAA CCT TTA CTA AAG GAG Val Met Asp Ala Lys Pro Leu Leu Lys Glu 375	380		2990 3033
GCT CTT CAA GCA GCA GTT GGC TTG CCT GTT GAC AAG AAG ATC Ala Leu Gln Ala Ala Val Gly Leu Pro Val Asp Lys Lys Ile 385	390	395	3075
CCT TTG ATT GGC TTC ATC GGC AGA CTT GAG GAG CAG AAA GGT Pro Leu Ile Gly Phe Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln Lys Gly 400	405	410	3117
TCA GAT ATT CTT GTT GCT GCA ATT CAC AAG TTC ATC GGA TTG Ser Asp Ile Leu Ala Val Ala Ile His Lys Phe Ile Gly Leu 415	420	425	3159
GAT GTT CAA ATT GTA GTC CTT Asp Val Gln Ile Val Val Leu 430		GTAAGTACCA AATGGACTCA	3200
TGGTATCTCT CTTGTTGAGT TTACTTGTGC CGAAACTGAA ATTGACCTGC TACTCATCCT ATGCATCAG GGA ACT GGC AAA AAG GAG TTT GAG Gly Thr Gly Lys Lys Glu Phe Glu 435	440		3250 3293
CAG GAG ATT GAA CAG CTC GAA GTG TTG TAC CCT AAC AAA GCT Gln Glu Ile Glu Gln Leu Glu Val Leu Tyr Pro Asn Lys Ala 445	450		3335
AAA GGA GTG GCA AAA TTC AAT GTC CCT TTG GCT CAC ATG ATC Lys Gly Val Ala Lys Phe Asn Val Pro Leu Ala His Met Ile 455	460	465	3377
ACT GCT GGT GCT GAT TTT ATG TTG GTT CCA AGC AGA TTT GAA Thr Ala Gly Ala Asp Phe Met Leu Val Pro Ser Arg Phe Glu 470	475	480	3419
CCT TGT GGT CTC ATT CAG TTA CAT GCT ATG CGA TAT GGA ACA Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu His Ala Met Arg Tyr Gly Thr 485	490	495	3461
GTAAGAACCA GAAGAGCTTG TACCTTTTA CTGAGTTTT AAAAAAGAA TCATAAGACC TTGTTTCCA TCTAAAGTTT AATAACCAAC TAAATGTTAC TGCAGCAAGC TTTTCATTTC TGAAAATTGG TTATCTGATT TTAACGTAAT			3511 3561 3611

CACATGTGAG TCAG GTA CCA ATC TGT GCA TCG ACT GGT GGA CTT		3655
Val Pro Ile Cys Ala Ser Thr Gly Gly Leu		
500	505	
GTT GAC ACT GTG AAA GAA GGC TAT ACT GGA TTC CAT ATG GGA		3697
Val Asp Thr Val Lys Glu Gly Tyr Thr Gly Phe His Met Gly		
510	515	520
GCC TTC AAT GTT GAA GTATGTGATT TTACATCAAT TGTGTACTTG		3742
Ala Phe Asn Val Glu		
525		
TACATGGTCC ATTCTCGTCT TGATATAACCC CTTGTTGCAT AAACATTAAC		3792
TTATTGCTTC TTGAATTGG TTAG TGC GAT GTT GTC GAC CCA GCT		3837
Cys Asp Val Val Asp Pro Ala		
530		
GAT GTG CTT AAG ATA GTA ACA ACA GTT GCT AGA GCT CTT GCA		3879
Asp Val Leu Lys Ile Val Thr Thr Val Ala Arg Ala Leu Ala		
535	540	545
GTC TAT GGC ACC CTC GCA TTT GCT GAG ATG ATA AAA AAT TGC		3921
Val Tyr Gly Thr Leu Ala Phe Ala Glu Met Ile Lys Asn Cys		
550	555	560
ATG TCA GAG GAG CTC TCC TGG AAG GTAAAGTGTGA ATTTGATAAT		3965
Met Ser Glu Glu Leu Ser Trp Lys		
565		
TTGCGTAGGT ACTTCAGTTT GTTGTCTCG TCAGCACTGA TGGATTCCAA		4015
CTGGTGTCT TGCAG GAA CCT GCC AAG AAA TGG GAG ACA TTG		4057
Glu Pro Ala Lys Lys Trp Glu Thr Leu		
570	575	
CTA TTG GGC TTA GGA GCT TCT GGC AGT GAA CCC GGT GTT GAA		4099
Leu Leu Gly Leu Gly Ala Ser Gly Ser Glu Pro Gly Val Glu		
580	585	590
GGG GAA GAA ATC GCT CCA CTT GCC AAG GAA AAT GTA GCC ACT		4141
Gly Glu Glu Ile Ala Pro Leu Ala Lys Glu Asn Val Ala Thr		
595	600	605
CCT TAA ATGAGCTTG GTTATCCTTG TTTCAACAAT AAGATCATTA		4187
Pro ***		
606		
AGCAAACGTA TTTACTAGCG AACTATGTAG AACCTATTAA TGGGGTCTCA		4237
ATCATCTACA AAATGATTGG TTTTGCTGG GGAGCAGCAG CATATAAGGC		4287
TGAAAATCC TGGTTAATGT TTTTGTAGGT AAGGGCTATT TAAGGTGGTG		4337
TGGATCAAAG TCAATAGAAA ATAGTTATTAA CTAACGTTG CAACTAAATA		4387
CTTAGTAATG TAGCATAAAT AATACTAGAA CTAGTAGCTA ATATATATGC		4437
GTGAATTGT TGTACCTTT CTTGCATAAT TATTGCACT ACATATATAA		4487
TGAAAATTAC CCAAGGAATC AATGTTCTT GCTCCGTCCT CCTTGATGA		4537
TTTTTACGC AATACAGAGC TAGTGTGTTA TGTTATAAAT TTTGTTAAA		4587

224

AGAAGTAATC AAATTCAAAT TAGTTGTTG GTCATATGAA AGAACGTGCC	4637
AGGCTAACTT TGAGGGAGATG GCTATTGAAT TTCAAAATGA TTATGTGAAA	4687
ACAATGCAAC ATCTATGTCA ATCAACACTT AAATTATTGC ATTAGAAAG	4737
ATATTTTGA GCCCATGACA CATTCAATTCA TAAAGTAAGG TAGTATGTAT	4787
GATTGAATGG ACTACAGCTC AATCAAAGCA TCTCCTTAC ATAACGGCAC	4837
TGTCTCTTGT CTACTACTCT ATTGGTAGTA GTAGTAGTAA TTTTACAATC	4887
CAAATTGAAT AGTAATAAGA TGCTCTCTAT TTACTAAAGT AGTAGTATTA	4937
TTCTTCGTT ACTCTAAAGC AACAAAA	4964

PATENTKRAV

1. Förfarande för undertryckande av amylosbildning i
5 potatis, kännetecknat av att potatisen förändras gentekniskt genom att man i potatisvävnadens genom inför en genkonstruktion omfattande ett fragment av den potatisgen som kodar för bildning av stärkelsekornbundet stärkelseesyntas (GBSS-genen) insatt i antisens-riktning,
10 vilket fragment är valt bland de fragment som har väsentligen de nukleotidsekvenser som anges i SEQ ID nr 1, SEQ ID nr 2 och SEQ ID nr 3 tillsammans med en promotor vald bland CaMV 35S, patatin I och GBSS-promotorn.
2. Nativ stärkelse av amylopektintyp, kännetecknad
15 av att den erhållits från potatis som förändrats gentekniskt för undertryckande av bildning av stärkelse av amylostyp.
3. Derivatiserad stärkelse av amylopektintyp,
kännetecknad av att den utgöres av stärkelse
20 av amylopektintyp som utvunnits ur potatis, vilken modifierats gentekniskt för undertryckande av bildning av stärkelse av amylostyp, vilken stärkelse av amylopektintyp där efter har derivatiserats på kemisk, fysikalisk eller enzymatisk väg.
- 25 4. Fragment av genen som kodar för stärkelsekornbundet stärkelseesyntas (GBSS) i potatis, vilket fragment är valt bland de fragment som har väsentligen de nukleotidsekvenser som anges i SEQ ID nr 1, SEQ ID nr 2 och SEQ ID nr 3.
- 30 5. Promotor till genen för stärkelsekornbundet stärkelseesyntas (GBSS) i potatis, vilken promotor är knölspecifik och har väsentligen den nukleotidsekvens som anges i SEQ ID nr 4.
- 35 6. Gen som kodar för stärkelsekornbundet stärkelseesyntas i potatis (GBSS-genen) som har väsentligen den nukleotidsekvens som anges i SEQ ID nr 5.

7. Antisens-konstruktion för inhibering av uttryck av genen för stärkelsekornbundet stärkelsesyntas i potatis omfattande
- a) en promotor,
- 5 b) ett fragment av genen som kodar för stärkelsekornbundet stärkelsesyntas, insatt i antisens-riktning, vilket fragment är valt bland de fragment som har väsentligen de nukleotidsekvenser som anges i SEQ ID nr 1, SEQ ID nr 2 och SEQ ID nr 3.
- 10 8. Antisens-konstruktion enligt krav 7, kännetecknade av att promotorn har väsentligen den sekvens som anges i SEQ ID nr 4.
9. Antisens-konstruktion enligt krav 7, kännetecknade av att promotorn är vald bland CAMV 35S-
- 15 -promotorn och patatinI-promotorn.
10. Vektor omfattande ett fragment av den gen som kodar för stärkelsekornbundet stärkelsesyntas (GBSS) i potatis, vilket fragment är valt bland de fragment som har väsentligen de nukleotidsekvenser som anges i SEQ ID nr 1,
- 20 SEQ ID nr 2 och SEQ ID nr 3, och är insatt i antisens-riktning.
11. Vektor omfattande antisens-konstruktionen enligt något av kraven 7-9.
12. Cell av potatisplanta, vars genom omfattar antisens-konstruktionen enligt något av kraven 7-9.
- 25 13. Potatisplanta, vars genom omfattar antisens-konstruktionen enligt något av kraven 7-9.
14. Potatisknölar, vilkas genom omfattar antisens-konstruktionen enligt något av kraven 7-9.
- 30 15. Frön från potatisplanta, vilkas genom innehåller antisens-konstruktionen enligt något av kraven 7-9.
16. Mikroknölar av potatis, vilkas genom omfattar antisens-konstruktionen enligt något av kraven 7-9.

SAMMANDRAG

5 Genteknisk förändring av potatis för undertryckande
av bildning av stärkelse av amylosotyp beskrivs.

Tre fragment för insättning i antisensriktning i po-
tatisgenomet beskrivs också. Vidare beskrivs antisens-
-konstruktioner, gener och vektorer omfattande nämnda an-
10 tisens-fragment. Likaså beskrivs en promotor till genen
som kodar för bildning av stärkelsekornbundet stärkelse-
syntas och även själva genen.

Även celler, plantor, knölar, mikroknölar och frön av
potatis omfattande nämnda antisens-fragment beskrivs.

15 Slutligen beskrivs stärkelse av amylopektintyp, både
nativ och derivatiserad, härrörande från den gentekniskt
förändrade potatisen, liksom ett förfarande för under-
tryckande av amylosbildning i potatis.

20

25

30

35